

鲜甘草细胞外囊泡提取工艺优化、表征及其抗乳腺癌活性研究

冉克梅¹, 曾祥华^{2#}, 栗丽君¹, 刘冬梅³, 谭丁豪⁴, 陈翔宇¹, 张维维^{2*}, 章津铭^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611130

2. 成都市第五人民医院, 四川 成都 611130

3. 汉源县人民医院, 四川 雅安 625302

4. 成都中医药大学智能医学院, 四川 成都 611130

摘要: **目的** 探索根茎类中药甘草鲜药材来源的细胞外囊泡 (*Glycyrrhiza uralensis* derived exosome-like nanovesicles, GELNs) 的提取工艺和性质表征, 并考察其抑制乳腺癌细胞增殖及血管新生作用。 **方法** 根据根茎类中药材性质, 优选药材处理方法和提取工艺, 采用动态光散射法、透射电子显微镜、纳米流式、脂质组学、蛋白质组学等方法对提取所得 GELNs 进行理化性质表征和物质组成分析; 从细胞摄取、细胞增殖和细胞凋亡角度, 考察 GELNs 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞的体外抗肿瘤作用; 采用人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 成管实验, 探究 GELNs 抑制血管生成作用。 **结果** 采用酶解法结合差速离心法提取得到 GELNs, 纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA)、纳米流式测定粒径分布分别为 (79.00±25.60)、(69.80±19.70) nm, 其磷脂双分子膜结构占比 75.20%; 通过蛋白质组学与脂质组学分析, 脂质组学共鉴定 29 种脂质亚类, 其中三酰甘油占比最高, 蛋白质组学定量 38 种蛋白并进行相关功能预测; 4T1、HUVEC 细胞均可高效摄取 GELNs, 其摄取结果呈剂量相关性, 在细胞内主要分布于细胞质部位; GELNs 可有效抑制 4T1 细胞增殖, 且诱导 4T1 细胞发生程序性凋亡; GELNs 可有效抑制 HUVECs 的体外成管, 且呈剂量相关性。 **结论** 对 GELNs 提取工艺和结构组成进行了研究, 初步考察了其在 4T1、HUVEC 细胞的摄取能力、细胞增殖影响、促细胞凋亡和影响血管形成能力, 提示 GELNs 是一种具有抗乳腺癌潜力的天然来源活性物质。

关键词: 甘草; 细胞外囊泡; 蛋白质组学; 脂质组学; 小鼠乳腺癌 4T1 细胞; 人脐静脉内皮细胞

中图分类号: R283; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)19-6947-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.19.007

Optimization of extraction process and characterization of extracellular vesicles from fresh *Glycyrrhiza uralensis* and their anti-breast cancer activities

RAN Kemei¹, ZENG Xianghua², SU Lijun¹, LIU Dongmei³, TAN Dinghao⁴, CHEN Xiangyu¹, ZHANG Weiwei², ZHANG Jinming¹

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China

2. Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China

3. Hanyuan County People's Hospital, Ya'an 625302, China

4. School of Intelligent Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China

Abstract: Objective To explore the extraction process and characterization of rhizome Chinese medicine *Glycyrrhiza uralensis* derived exosome-like nanovesicles (GELNs), and investigate their inhibitory effects on breast cancer cell proliferation and angiogenesis. **Methods** Based on the properties of rhizome-type traditional Chinese medicinal materials, the preferred processing methods and extraction techniques were selected, GELNs were characterized by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), nano-flow cytometry (NanoFCM), lipidomics and proteomics to analyze physicochemical properties and composition. The antitumor effects of GELNs against mouse breast cancer 4T1 cells were assessed through cellular uptake,

收稿日期: 2025-04-29

基金项目: 校院联合创新基金项目 (LH202402003)

作者简介: 冉克梅, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 17584939699 E-mail: rankemei@stu.cdutcm.edu.cn

#共同第一作者: 曾祥华, 工程师, 主要从事肿瘤放射性治疗与质量控制研究。Tel: 13540033279 E-mail: 244420921@qq.com

*通信作者: 张维维, 主治医师, 主要从事肿瘤生物治疗基础与临床研究。Tel: 18227631838 E-mail: zww89@126.com

章津铭, 教授, 主要从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: (028)82633990 E-mail: cdutcmzjm@126.com

proliferation inhibition and apoptosis induction. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tube formation assays was used to evaluate anti-angiogenic activity. **Results** GELNs were extracted by enzymatic hydrolysis method and differential centrifugation. Nanoparticle tracking analysis (NTA) and NanoFCM were used to determine the particle size distribution, which were (79.00 ± 25.60) and (69.80 ± 19.70) nm, respectively. The proportion of phospholipid bilayer membrane structure was 75.20%; Proteins and lipids in GELNs were identified and quantified, Lipidomics identified a total of 29 lipid class, among which triglycerides accounted for the highest proportion. Proteomics quantified 38 proteins and conducted relevant functional predictions; 4T1 and HUVEC cells could efficiently uptake GELNs, and the uptake results were dose-dependent, mainly distributed in the cytoplasm of cells; GELNs could effectively inhibit the proliferation of 4T1 cells and induce programmed apoptosis of 4T1 cells; GELNs could effectively inhibit the *in vitro* tube formation of HUVECs and exhibit a dose-dependent effect. **Conclusion** The extraction process and structural composition of GELNs were studied, and their uptake ability in 4T1 and HUVEC cells, effects of cell proliferation, apoptosis promotion and angiogenesis were preliminarily investigated. It is suggested that GELNs are a natural source active substance with anti-breast cancer potential.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; extracellular vesicles; proteomics; lipidomics; mouse breast cancer 4T1 cells; human umbilical vein endothelial cells

近年来,植物来源的细胞外囊泡(plant-derived extracellular vesicles, PDEVs)被认为是一种非常有前途的天然囊泡颗粒^[1],不仅具有脂质双层膜的特殊结构,还携带蛋白质、核酸及 RNA 等天然活性分子。因其来源广泛、成本低廉、低免疫原性、体内稳定性好,具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用,以及较好的载药性能和炎症组织趋向性等优点^[2],PDEVs 在多种临床疾病治疗中展示出较好的应用前景。人参^[3]来源的外泌体样纳米颗粒在体内、外能够改善炎症以及氧化应激,通过下调 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) / 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路,同时协同增强核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 的抗氧化活性,调节免疫反应减轻炎症性肠病;口服大蒜^[4]来源的纳米颗粒可以促进肠道内源性 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖和活化,诱导 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) + $\gamma\delta$ T 细胞扩增并迁移至远端肿瘤,重塑免疫微环境且与抗程序性死亡配体-1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 协同作用,诱导强大的抗肿瘤免疫。

应用中药鲜药治疗疾病是中医药特色方式^[5]。中医临床应用鲜药的历史最早可追溯到秦汉时期,《五十二病方》^[6]中最早有关于中药鲜药使用的记载,《神农本草经》中也记载“生者优良”之说。我国的鲜药资源丰富,在 2 000 多种常用中药中,有 486 种中药以鲜品入药的用法^[7],如青蒿、鱼腥草、桑叶、艾叶、马齿苋、人参等,其临床常用方法为自然汁内服/外用、捣烂外敷、蒸露等^[8]。近年来,从中药鲜药材中分离提取植物囊泡在抗肿瘤方面受到广泛关注。研究显示,鲜何首乌^[9]榨汁后提取

其细胞外囊泡,发现其可能通过调节细胞周期相关通路发挥抗肝癌作用。

甘草被喻为“国老”^[10]。现代研究表明甘草具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、免疫调节等作用^[11]。生甘草性甘偏凉,长于泻火解毒、化痰止咳。临床多用于痰热咳嗽、咽喉肿痛、痈疽疮毒、食物、药物中毒^[12]。生甘草的传统给药途径以水煎剂型为主,张锡纯在《医学衷中参西录·药物篇》中明确指出:“若治疮疡亦宜生用,或用生者煎服亦可”。《古代经典名方目录》明确标注使用生甘草的 6 首方剂(如四君子汤等)均采用水煎法^[13]。目前研究多关注甘草中皂苷、黄酮、多糖等成分生物活性^[14],对甘草鲜品中纳米囊泡的研究鲜有报道。此外,植物囊泡多从果实类、叶类植物中提取,较少对根茎类中药鲜品的植物囊泡开展研究。本研究对鲜甘草细胞外囊泡 (*Glycyrrhiza uralensis* derived exosome-like nanovesicles, GELNs) 开展提取工艺考察和结构、组成表征研究,并对 GELNs 诱导小鼠乳腺癌 4T1 细胞凋亡和抑制血管新生作用进行初步研究,为 GELNs 抗肿瘤应用研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞

4T1 细胞(批号 STCC00077P-1)购自赛维尔生物科技有限公司细胞库;人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)由中科院上海细胞生物学研究所提供。

1.2 药材

鲜甘草购自甘肃省民勤县,经成都中医药大学陈江教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根茎。

1.3 药品与试剂

纤维素酶生物技术级(批号 C16630749)、果胶酶生物技术级(批号 C17032358)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; RPMI 1640 培养基(批号 8123594)、DMEM 培养基(批号 6125076)购自美国 Gibco 公司; PBS 缓冲液(批号 G4202)、青霉素-链霉素(批号 GA2412005)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胰蛋白酶(批号 19G04A65)购自武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清(批号 24030701)购自浙江天航生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度试剂盒(批号 P0006C)购自碧云天生物技术有限公司; 外泌体绿色荧光标记染料 PKH67(批号 D0031)购自江苏优逸兰迪生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 BS350B)、鬼笔环肽(批号 BL1190A)、抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI, 批号 BL701AB)购自北京兰杰柯科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号 FXP018Pro)购自苏州四正柏生物技术有限公司; Matrigel 基质胶(批号 17824004)购自康宁显示科技有限公司。

1.4 仪器

GYL-Y96 型榨汁机(九阳股份有限公司); 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Fresco17 型冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SinoCyte-85 型流式细胞仪(中生医疗科技有限公司); TSC SP8 STED 型超高分辨成像系统(德国 Leica 公司); Litesizer 500 型激光纳米粒度分析仪

(上海安东帕商贸有限公司); NanoFCM U30 型单颗粒纳米检测仪(厦门福流生物科技有限公司); RESUN-G01Nanocoulter 纳米粒度仪(瑞芯智造科技有限公司); MK3 型酶标仪(芬兰雷勃集团公司); JEM-1230 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

2 方法

2.1 GELNs 的提取与表征

2.1.1 GELNs 提取工艺考察 由于鲜甘草根茎具有一定的纤维性, 故本研究对比甘草鲜药材的 3 种前处理方法, 并在最优药材处理方法基础上, 采用差速离心法提取制备 GELNs。

(1) 机械破碎法: 将洗净后的新鲜甘草根茎切碎后, 使用榨汁机破壁处理, 纱布滤过取汁液, 采用差速离心提取囊泡(C-GELNs)。

(2) 冷浸提取法: 将洗净后的新鲜甘草根茎切碎后, 加入 3 倍体积的 PBS 缓冲液, 4 °C 浸泡 4 h, 纱布滤过取汁液, 采用差速离心法提取囊泡(I-GELNs)。

(3) 酶解法: 在冷浸提取法基础上, 在纱布滤液中加入纤维素酶(2 g/L)、果胶酶(3 g/L), 酶解处理 2 h, 采用差速离心法提取囊泡(GELNs)。

将鲜药材所得滤液在 4 °C 条件下, 依次采用 1 000×g 离心 10 min、3 000×g 离心 20 min、10 000×g 离心 1 h, 取上清液, 100 000×g 离心 1 h, 弃去上清液, 加入 1 mL PBS 缓冲液重悬沉淀, 0.80 μm 微孔滤膜滤过, 即得到 GELNs(图 1), 在-80 °C 保存备用。采用粒径分布和囊泡形态对 3 种提取工艺所得囊泡进行对比优选。



图 1 3 种提取工艺制备 GELNs 流程图

Fig. 1 Flowchart of three extraction processes for preparing GELNs

2.1.2 透射电镜观察形态 将镀碳支持膜铜网放到封口膜上,取适量样品到支持膜上,停留 10 min,采用磷钨酸染色 90 s,用带尖的滤纸吸去多余的染液,夹至滤纸上干燥 3 h,在透射电镜下观察囊泡微观结构并拍照。

2.1.3 动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 法测定 取 100 μL 样品,用 PBS 缓冲液稀释至透光率高于 75%,基于 DLS 原理,采用纳米激光粒度仪测定囊泡粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI),连续测定 3 次。

2.1.4 纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 用 PBS 缓冲液将样品稀释 5×10^4 倍并吹打均匀,取适量样品缓慢加入 NTA 检测槽中,设置软件程序,调焦,保证视野范围内颗粒呈现不规则布朗运动,以 30~40 个颗粒为最佳,读数并记录。

2.1.5 外泌体纳米流式 (NanoFCM) 分析 将样品用 PBS 缓冲液稀释至最佳浓度 (5×10^9 颗粒/mL),通过 NanoFCM 检测单个颗粒的散射信号。依据校准曲线将散射信号强度转换为粒径值,生成粒径直方图。取 90 μL 样品 (6×10^9 颗粒/mL),加入 10 μL 10% Triton X-100,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 以裂解脂质膜囊泡,使用 NanoFCM 测定样品纯度。

2.1.6 GELNs 脂质组学检测 取 170 μL 样品,加入 1 mL 脂质提取液 (甲基叔丁基醚-甲醇 3:1),室温下 2 500 r/min 振荡 5 min;加入 200 μL 超纯水,振荡 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 1 min,移取上清液 500 μL 至离心管中,于 20 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹干燥;加入 200 μL 脂质复溶液 (乙腈-异丙醇 1:1),涡旋 3 min,12 000 r/min 离心 3 min,移取上清液用于检测。后续 LC-MS/MS 检测、脂质定量与定性由武汉迈为代谢生物科技股份有限公司完成。

2.1.7 GELNs 蛋白质组学检测 按样品与裂解液体积比 1:10 的比例,加入含蛋白酶抑制剂的裂解液 (8 mol/L 尿素、1% SDS),冰上超声 2 min 后放置 30 min 以充分裂解。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 30 min,取上清,采用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。后续 LC-MS/MS 检测、蛋白质定量与生物信息分析由武汉迈为代谢生物科技股份有限公司完成。

2.1.8 GELNs 稳定性 将样品置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,每天于同一时间点使用 DLS 测定粒径的大小,连续测定 7 d,观察样品粒径分布变化。

2.1.9 溶血实验 取兔子腹主动脉血,用生理盐水清洗并制成红细胞混悬液,设置阳性对照组、阴性对照组和实验组,阳性对照组加入 0.1% 曲拉通,阴性对照组加入生理盐水,实验组加入不同质量浓度 (0.05、0.10、0.20 mg/mL,以囊泡所含蛋白质量浓度计) 的 GELNs,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,1 000 $\times g$ 离心 5 min,542 nm 波长下测定吸光度 (A) 值,计算各组溶血率。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{阴性对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}})$$

2.2 细胞培养

细胞复苏后,4T1 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI 1640 培养基, HUVEC 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行实验。

2.3 GELNs 对 4T1、HUVEC 细胞增殖的影响

取对数生长期的细胞以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,细胞贴壁后,设置对照组和不同质量浓度 (0.025、0.050、0.100、0.200、0.400、0.600 mg/mL,以囊泡蛋白质量浓度计) 的 GELNs 组,孵育 24 h,另设置不接种细胞不给药的空白孔。加入 10% CCK-8 溶液,避光孵育 3 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测 A 值,计算细胞存活率和半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 GELNs 在 4T1、HUVEC 细胞中的摄取行为

使用荧光探针 PKH67 与 GELNs 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,对 GELNs 进行荧光标记,采用超高速离心 100 000 $\times g$ 离心 1 h 去除游离染料。将处于对数生长时期的 4T1、HUVEC 细胞,分别以 2×10^5 个/孔接种于 12 孔板中,4T1 细胞贴壁后弃去培养基,加入含 PKH67-GELNs (0.05、0.10、0.20 mg/mL) 的新鲜培养基; HUVEC 细胞贴壁后弃去培养基,加入含 PKH67-GELNs (0.05、0.10、0.15 mg/mL) 的新鲜培养基。培养 2 h 后,胰酶消化,离心收集细胞,加入少量 PBS 缓冲液重悬细胞,使用流式细胞术进行分析。

将 4T1、HUVECs 细胞分别以 1.5×10^5 个/皿接种于共聚焦皿,细胞贴壁生长后,加入含 PKH67-GELNs (0.05 mg/mL) 的新鲜培养基,培养 2 h 后,弃去培养基。使用福尔马林固定细胞 20 min,再使用鬼笔环肽 (5 $\mu\text{g/mL}$) 和 DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$) 对细胞骨架与细胞核进行染色,随后使用超分辨成像系统

进行荧光成像并拍摄图片。

2.5 流式细胞术检测 GELNs 对 4T1 细胞凋亡的影响

将处于对数生长期的 4T1 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中,细胞贴壁后弃去培养基,设置对照组和 GELNs (0.05、0.10、0.20 mg/mL) 组,分别加入空白培养基和含 GELNs 的培养基处理 4 h, PBS 缓冲液清洗 2 次。用胰酶消化、离心收集细胞,适量 PBS 缓冲液重悬细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC 荧光标记试剂避光孵育 5 min; 再加入 10 μ L PI 染色剂吹打混匀后,立即上机检测。

2.6 GELNs 对 HUVEC 细胞体外成管能力的影响

预先将 Matrigel 基质胶均匀铺于 96 孔板中,待基质胶凝固。将处于对数生长期的 HUVEC 细胞

以 1.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,加入含不同蛋白质量浓度 (0、0.05、0.10、0.15 mg/mL) GELNs 的培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养,培养 5 h 后在显微镜下进行观察。采用 Image J 软件分析各组细胞新生血管的总长度并进行统计。

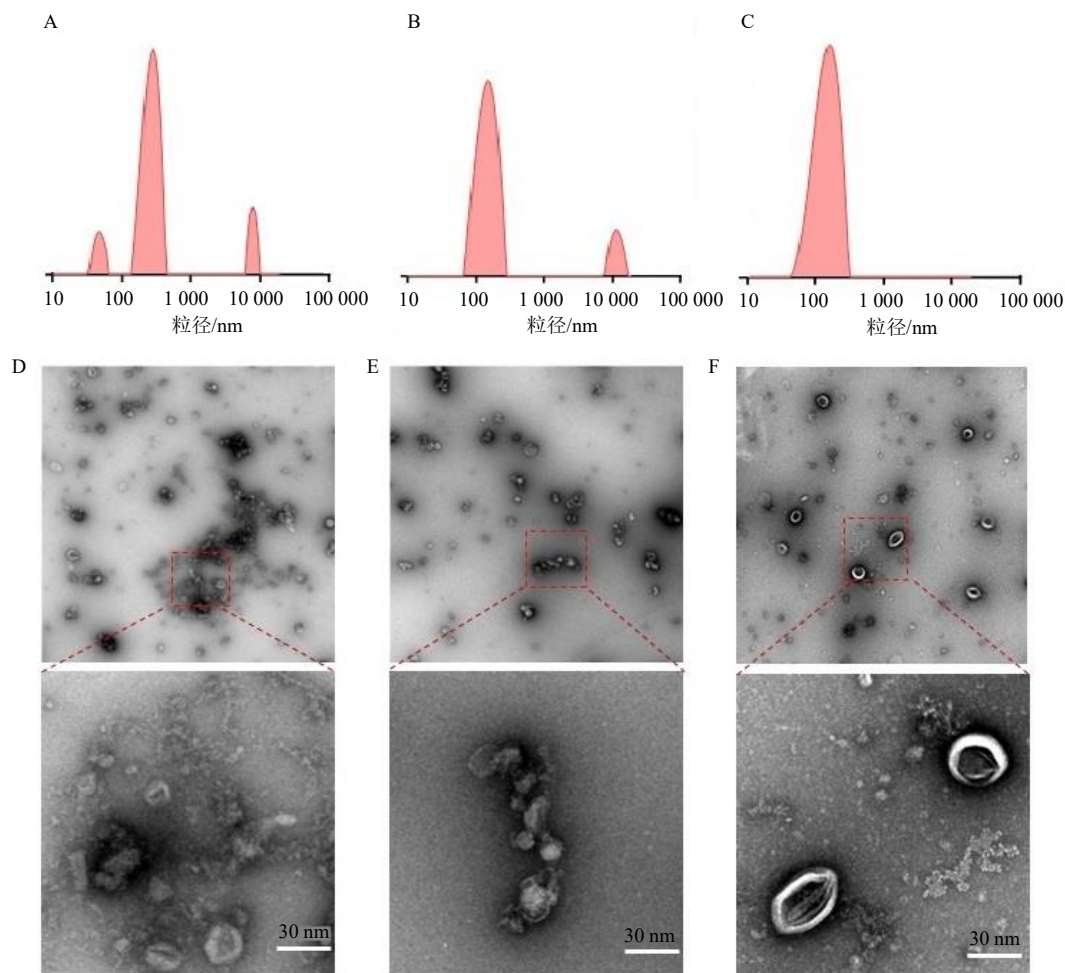
2.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析,采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析进行检验。

3 结果

3.1 3 种提取工艺所得囊泡的对比分析

DLS 测定结果 (图 2-A~C) 显示, C-GELNs、I-GELNs、GELNs 的粒径分别为 (296.77 ± 12.92) 、



A、D 为 C-GELNs 样品; B、E 为 I-GELNs 样品; C、F 为 GELNs 样品。

A, D are C-GELNs sample; B, E are I-GELNs sample; C, F are GELNs sample.

图 2 3 种提取工艺所得囊泡的粒径分析 (A~C) 与透射电镜形态 (D~F, $\times 30\,000$)

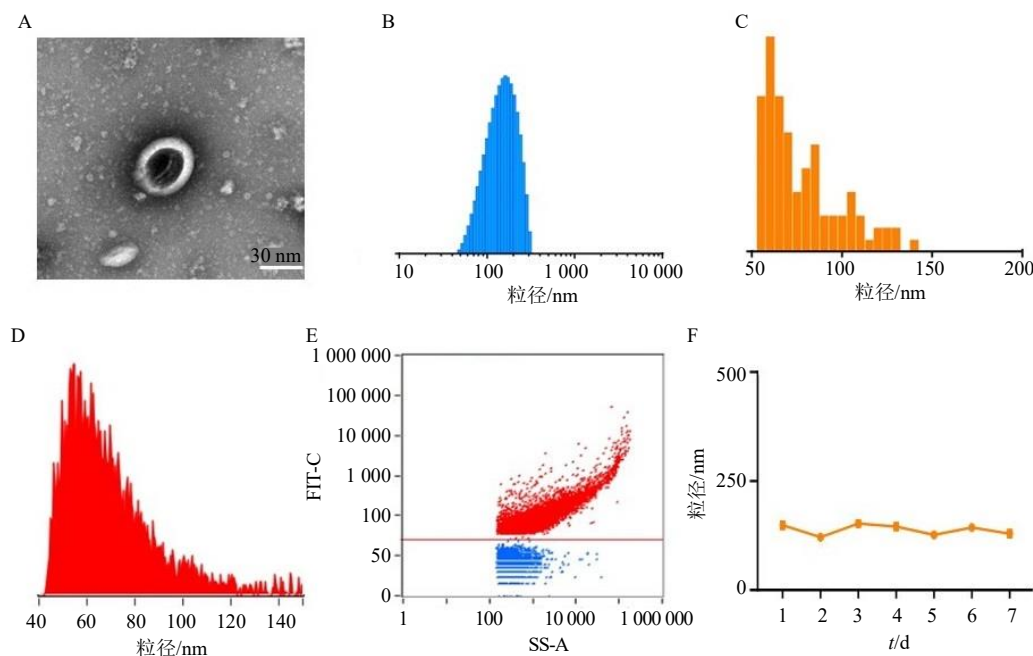
Fig. 2 Particle size analysis (A~C) and transmission electron microscopy morphology (D~F, $\times 30\,000$) of vesicles obtained from three extraction processes

(159.25 ± 9.21)、(162.56 ± 5.89) nm, PDI 分别为 31.47%、23.40%、5.30%。GELNs 的 PDI 低于 C-GELNs、I-GELNs, 表明其粒径分布更均一, 分散性更优。C-GELNs、I-GELNs、GELNs 的 BCA 蛋白含量测定结果分别为 1.00、0.64、1.12 mg/mL。进一步通过透射电镜观察各组囊泡的微观形貌, 结果见图 2-D~F, C-GELNs 囊泡旁附着大量杂质, 推测为杂蛋白或纤维果胶聚集物; I-GELNs 中出现囊泡破裂现象; 而 GELNs 的形状为典型的茶托杯状且含杂质较少。综上, 根据粒径、PDI、蛋白含量及形态的结果分析, 采用酶解法所获得的 GELNs 粒径更均一、形态更佳, 故用于后续研究。

3.2 GELNs 的表征及稳定性研究

经酶解法处理后, 采用差速离心提取得到 GELNs。透射电镜观察其形态为典型的茶托状, 且有清晰的双层膜结构(图 3-A)。利用不同原理的仪

器测量囊泡粒径, DLS 测量的是颗粒在溶液中的流体力学直径, 测定的是颗粒的水合粒径且对颗粒聚集纳米敏感, 导致测量粒径偏大但统计更可靠。而 NTA 测量的是排除水合层干扰直接测量纳米颗粒, 偏向统计单颗粒数粒径。结果显示, DLS 测定的粒径为 (162.56 ± 5.89) nm (图 3-B), 通过 NTA、NanoFCM 测定的粒径分别为 (79.00 ± 25.60)、(65.00 ± 25.00) nm (图 3-C、D), 同时通过 NanoFCM 测得囊泡颗粒浓度为 1.43×10^{12} 颗粒/mL, 含有的磷脂双分子膜结构的囊泡占比为 75.20% (图 3-E)。BCA 蛋白定量测得蛋白质质量浓度为 1.10 mg/mL。此外, 通过 DLS 连续 7 d 监测 GELNs 贮藏过程的粒径变化(图 3-F), 结果显示 GELNs 低温贮藏 7 d 内粒径保持稳定。综合以上结果, 本研究成功从根茎特性的鲜甘草药材中分离出理化性质较稳定的植物囊泡。



A-透射电镜图 ($\times 30\,000$); B-DLS 粒径图; C-NTA 粒径分布图; D-NanoFCM 粒径分布图; E-NanoFCM 纯度分布图; F-低温贮藏稳定性图。
A-transmission electron microscopy image ($\times 30\,000$); B-DLS particle size plot; C-NTA particle size distribution plot; D-NanoFCM particle size distribution; E-NanoFCM purity distribution; F-low-temperature storage stability plot.

图 3 GELNs 的表征

Fig. 3 Characterization of GELNs

3.3 GELNs 的脂质组学分析

采用 LC-MS 对 GELNs 的脂质组成进行分析, 结果显示, GELNs 含脂质亚类 29 个、脂质分子 379 个。对丰富度排名前 10 的脂质亚类进行分析(图 4), 结果显示, 主要由三酰甘油、植物神经酰胺、

二酰甘油、游离脂肪酸、神经酰胺等组成, 以三酰甘油相对丰度最高, 占脂质总量的 50%, 植物神经酰胺、二酰甘油次之, 各均占 9%。其中三酰甘油与二酰甘油为脂代谢重要中间产物, 而神经酰胺类(植物神经酰胺、神经酰胺)在细胞的生长、增殖和

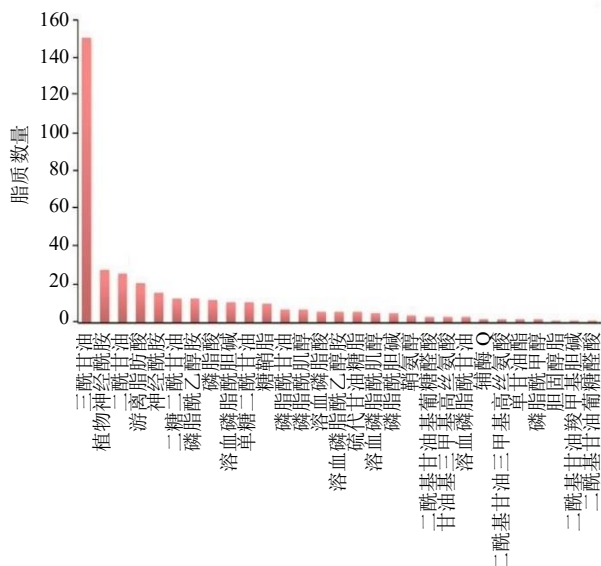
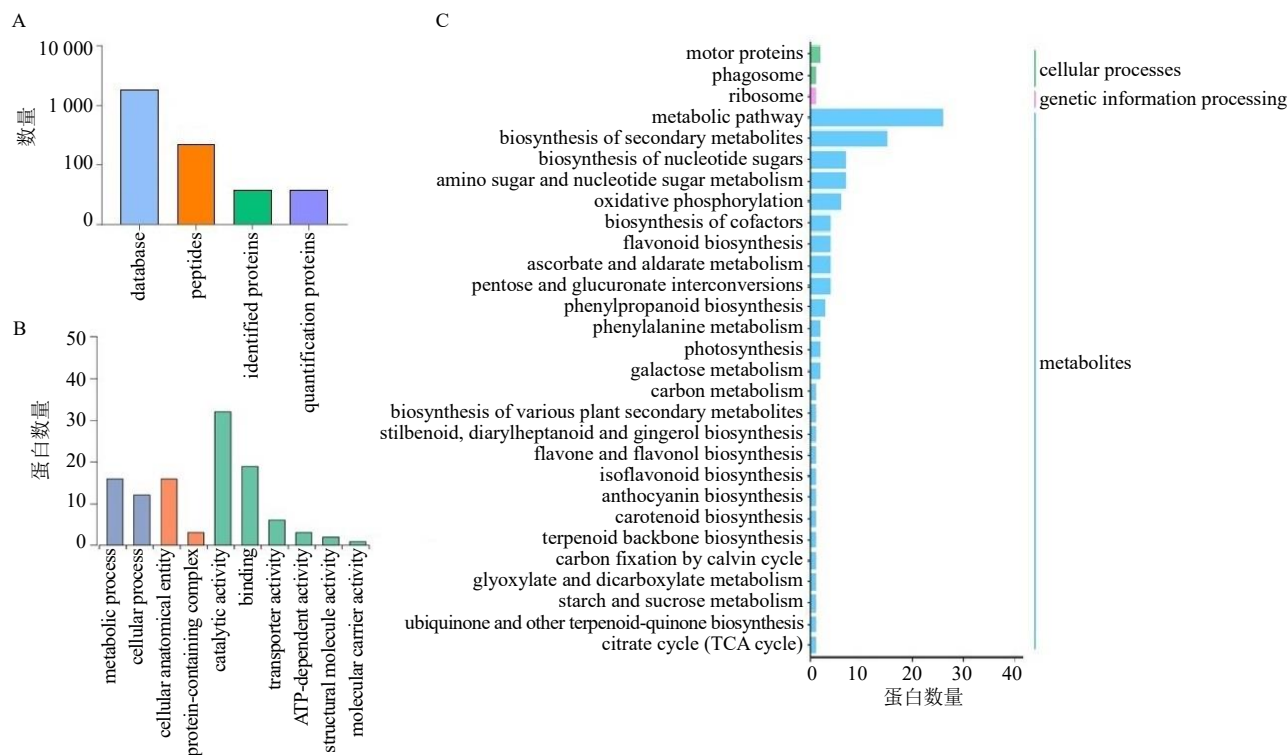


图 4 GELNs 的脂质亚类分子数量
Fig. 4 Number of lipid class of GELNs



A-GELNs 蛋白组成; B-GO 功能富集分析; C-KEGG 通路富集分析。

A-GELNs protein composition; B-GO function enrichment analysis; C-KEGG pathway enrichment analysis.

图 5 GELNs 的蛋白质组学分析结果
Fig. 5 Proteomic analysis results of GELNs

3.5 GELNs 的体外安全性评价

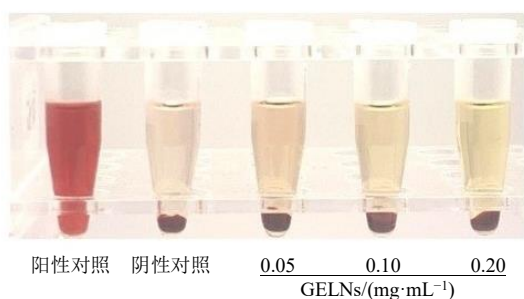
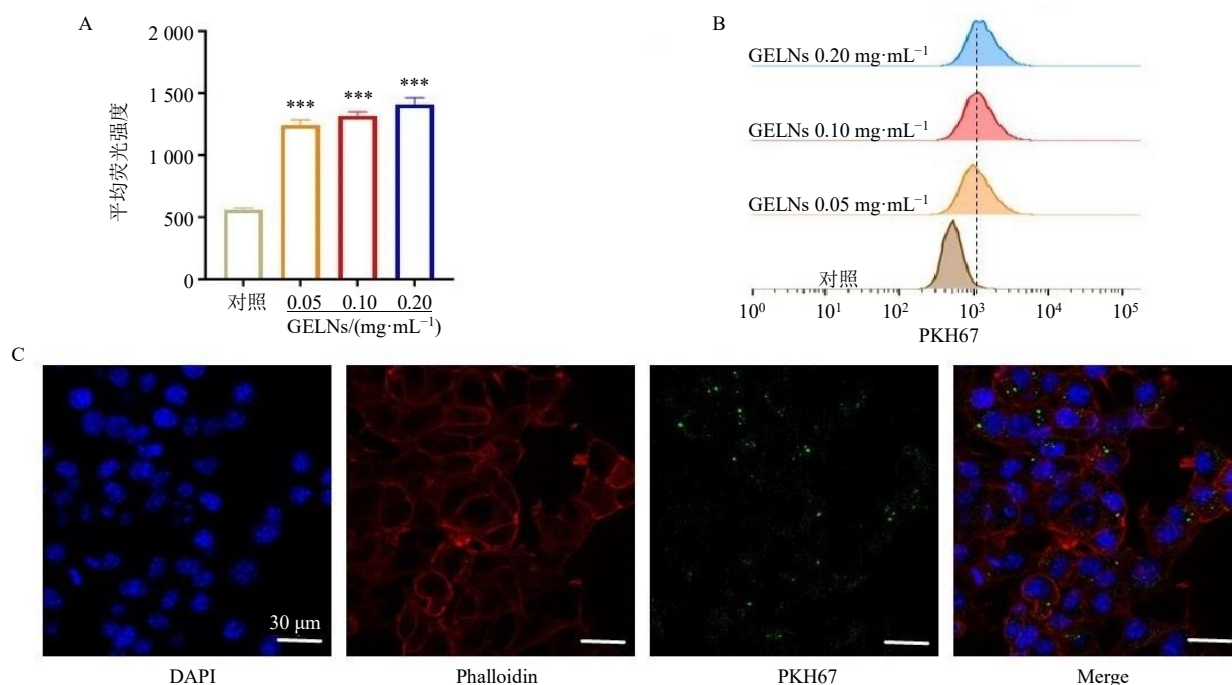
采用体外溶血实验评估 GELNs 生物安全性, 结果如图 6 所示, 阳性对照组溶液为红色, 管底无红细胞聚集, 提示为完全溶血; 阴性对照组溶液透

调亡的生物过程中具有重要的调节作用。上述脂质组成特征分析为探究 GELNs 的生物学功能提供了脂质物质基础依据。

3.4 GELNs 的蛋白质组学分析

采用蛋白质组学对 GELNs 蛋白组成进行分析, 结果见图 5-A, 共鉴定到 226 条长度分布符合质控的肽段, 可定量 37 种蛋白。对蛋白质进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释, 结果见图 5-B, 共得到参与生物过程的 28 种蛋白, 参与细胞组分的 63 种蛋白, 参与分子功能的 29 种蛋白, 提示 GELNs 所含蛋白可能在生物代谢过程、分子催化活性及细胞结构组成等方面发挥功能。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析结果见图 5-C, 涉及的 29 条通路中, 与代谢途径相关的通路占比最高。值得注意的是, 在氨基糖和核苷酸糖代谢、类黄酮生物合成等通路中观察到显著的蛋白质富集现象。

明, 管底可见明显红细胞聚集, 表明未发生溶血; GELNs 各剂量组未出现溶血现象。通过 A 值计算 GELNs 各剂量组溶血率为 3.60%、1.40%、0.40%, 均低于 4% 的安全值。表明 GELNs 无明显溶血现

图 6 GELNs 的体外安全性实验 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 6 *In vitro* safety tests of GELNs ($\bar{x} \pm s, n=3$)与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.图 7 流式细胞术 (A、B) 和免疫荧光法 (C, $\times 20$) 分析 4T1 细胞对 GELNs 摄取情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 7 Analysis of GELNs uptake by 4T1 cells using flow cytometry (A, B) and immunofluorescence (C, $\times 20$) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

来自 PKH67-GELNs, 结果显示, GELNs 主要分布在细胞核周围区域 (图 7-C), 表明 GELNs 被 4T1 细胞内化, 主要分布在细胞质。

3.7 GELNs 对 4T1 细胞生长的抑制作用及促凋亡作用

采用 CCK-8 法检测 GELNs 对 4T1 细胞增殖的影响, 结果显示, 0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL 的 GELNs 显著抑制 4T1 细胞增殖 ($P < 0.05$ 、0.001, 图 8-A), 且具有剂量相关性。通过曲线拟合计算得 $IC_{50} = 0.267$ mg/mL。采用不同质量浓度 (0.05、0.10、0.20 mg/mL) 的 GELNs 处理 4T1 细胞 4 h, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况, 结果见图 8-B、

象, 提示其生物安全性良好。

3.6 4T1 细胞对 GELNs 的摄取情况

采用荧光探针 PKH67 标记 GELNs 分析其在 4T1 细胞的摄取情况。流式细胞术结果显示, PKH67-GELNs 在 4T1 细胞中的荧光强度随囊泡蛋白质量浓度的增加而显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001, 图 7-A、B), 提示 4T1 细胞对 GELNs 的摄取行为具有剂量相关性。对 0.05 mg/mL 的 PKH67-GELNs 在 4T1 细胞中的摄取情况进行成像观察, 蓝色荧光标记细胞核, 红色荧光标记细胞骨架, 绿色荧光信号

C, 与对照组比较, GELNs 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。以上结果表明, GELNs 在体外能有效抑制 4T1 细胞增殖, 并诱导 4T1 细胞凋亡, 为其潜在的抗乳腺癌作用提供实验依据。

3.8 GELNs 在 HUVEC 中的摄取行为及抑制成管作用

采用荧光探针 PKH67 标记 GELNs 分析其在 HUVEC 中的摄取情况。流式细胞术结果显示, GELNs 组平均荧光强度值均高于对照组 ($P < 0.001$, 图 9-A、B), 且具有剂量相关性。对 0.05 mg/mL 的 PKH67-GELNs 在 HUVEC 中的摄取情况进行成像观察, 结果见图 9-C, HUVEC 可将 PKH67-

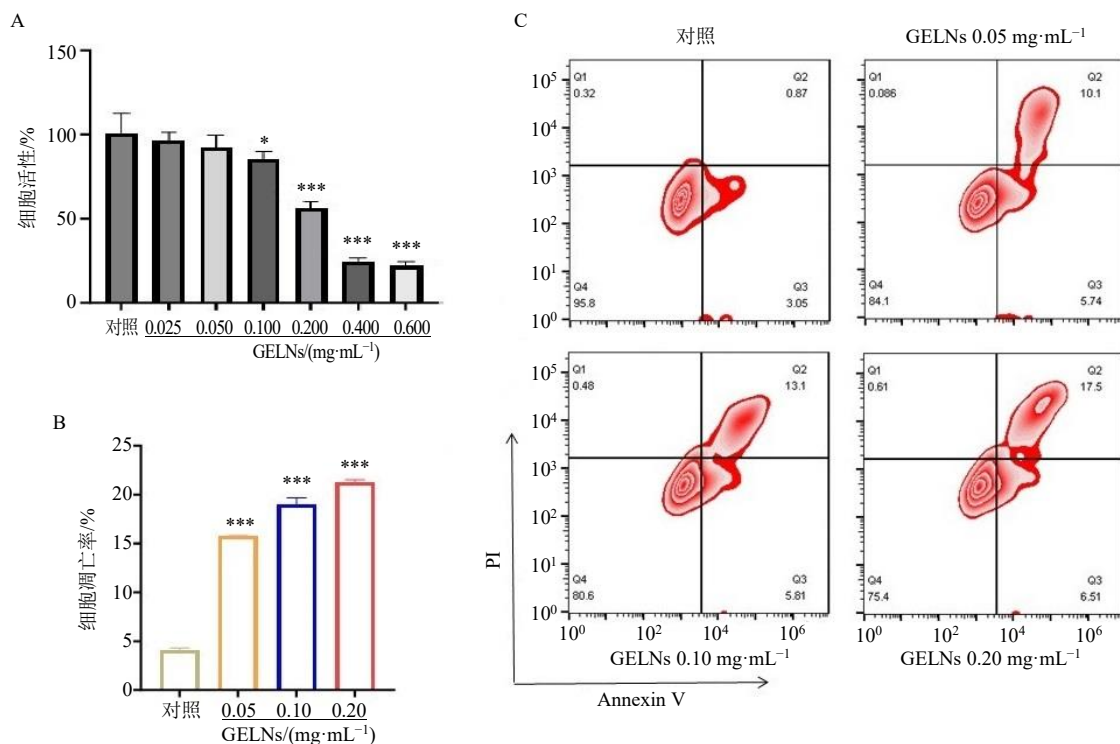


图 8 GELNs 对 4T1 细胞生长的抑制作用 (A) 及促凋亡作用 (B、C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Inhibitory effect (A) and pro-apoptotic effect (B, C) of GELNs on growth of 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

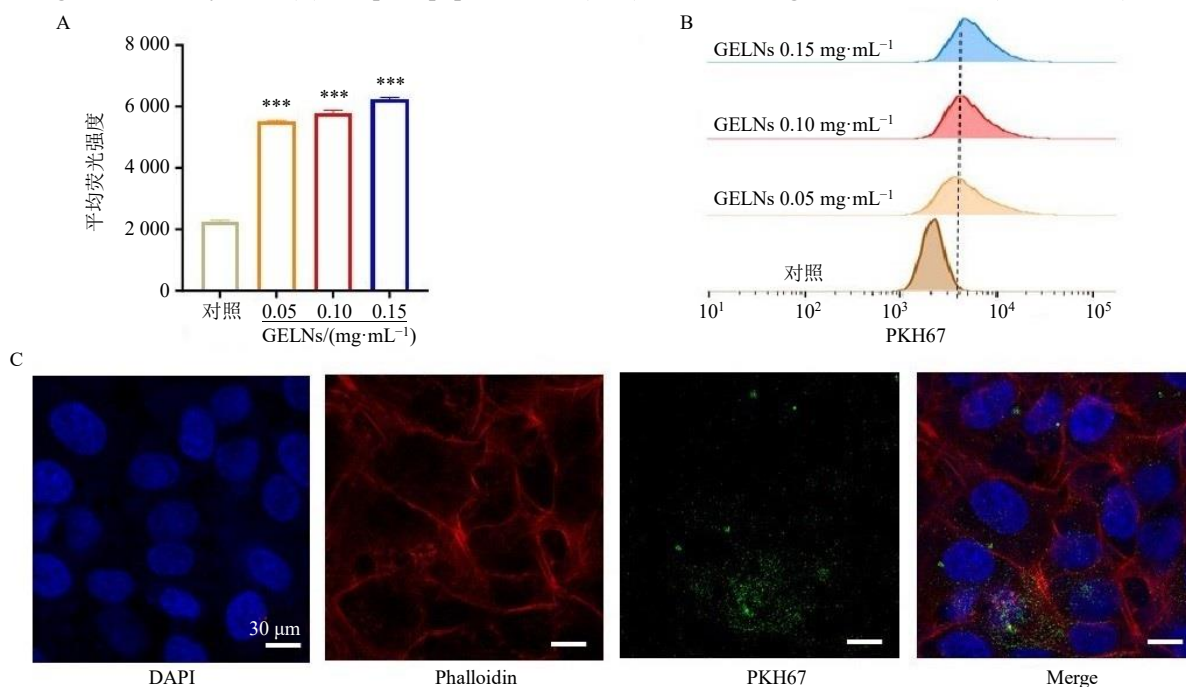


图 9 流式细胞术 (A、B) 和免疫荧光法 (C, $\times 20$) 分析 HUVEC 对 GELNs 摄取情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Analysis of GELNs uptake by HUVEC using flow cytometry (A, B) and immunofluorescence (C, $\times 20$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

GELNs 内吞，且主要分布在细胞核附近。

采用 CCK-8 法检测 GELNs 对 HUVEC 增殖的影响，结果如图 10-A 所示，0.025、0.050、0.100

mg/mL 的 GELNs 对 HUVEC 的活性无明显影响，0.200、0.400、0.600 mg/mL 的 GELNs 显著抑制 HUVEC 增殖 ($P < 0.05$ 、0.001)。考察 0.05、0.10、

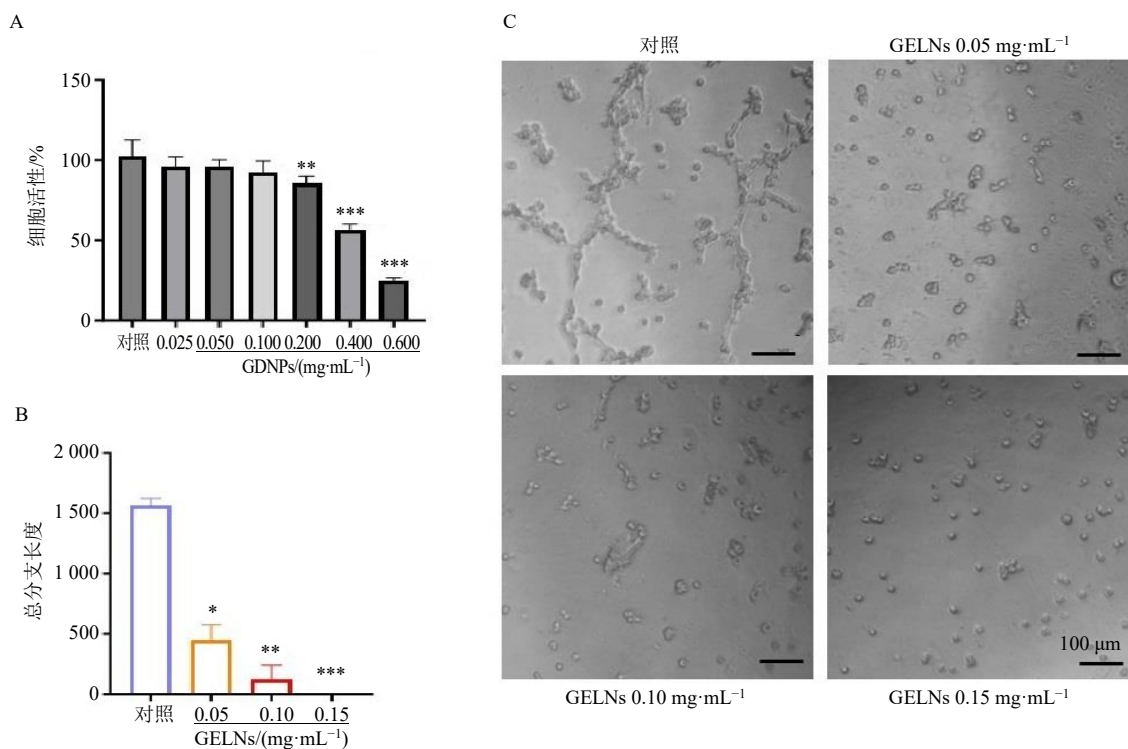


图 10 GELNs 对 HUVECs 生长 (A) 及血管生成 (B、C, $\times 10$) 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Inhibitory effect of GELNs on growth (A) and angiogenesis (B, C, $\times 10$) of HUVECs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.15 mg/mL 的 GELNs 对 HUVEC 血管生成的影响, 结果见图 10-C, 对照组细胞出现明显聚集, 形成了初级的血管状网络结构, 而 GELNs 各给药组无完整的管状结构。使用 Image J 软件量化各组血管的总分支长度 (图 10-B), 结果显示, 与对照组比较, GELNs 各给药组的总分支长度均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且呈剂量相关性。以上结果表明, HUVEC 对 GELNs 主动摄取后, GELNs 在胞内发挥抑制 HUVEC 血管生成的作用。

4 讨论

细胞外囊泡提取工艺需依据药材特性制定。对于甘草这类富含膳食纤维的根部中药材, 机械破碎虽能直接破坏细胞结构, 却易破坏细胞膜结构, 导致果胶与纤维素交织成絮状沉淀, 影响囊泡分离效果^[15-17]。组织浸润法相对温和, 可降低对细胞的损伤, 但提取所得的囊泡浓度偏低, 且多用于叶片类药材^[18]。酶解法凭借纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶的协同作用, 精准瓦解细胞壁, 既能减少杂质干扰, 又能保障囊泡的完整性与纯度。有学者从巴戟天^[19]与长春花叶片^[20]中提取的纳米颗粒及囊泡的纯度与均匀度也印证了这一点。鉴于此, 本研究综合考量后, 选定机械破碎、浸泡、酶解 3 种初处理

方法, 经对提取囊泡进行一系列基础表征对比后, 酶解法提取的 GELNs 形态最佳, 且 GELNs 中磷脂双分子结构占比 75.20%, 表明提取到纯度较高的细胞外囊泡。以上初处理工艺考察为根茎类药材提取囊泡提供了参考。

PDEVs 在肿瘤治疗领域展现出多重调控优势, 如桔梗^[21]来源的外泌体通过抑制肿瘤细胞增殖、重塑肿瘤微环境、调节肠道菌群 3 方面, 实现了对三阴性乳腺癌的有效干预; 鸦胆子^[22]来源的细胞外囊泡既能抑制三阴性乳腺癌细胞生长并抑制血管生成, 又能作为载体成功递送 miRNA, 显著延缓 4T1 细胞的生长和转移。近年来, 甘草在肿瘤治疗中的应用亦备受关注, 现有研究大多围绕甘草素、甘草酸与甘草次酸^[23-25]等小分子活性物质开展研究。本研究聚焦于从鲜甘草中提取的纳米囊泡 GELNs, 体外实验结果提示其可能通过抑制乳腺癌细胞增殖、促进细胞凋亡、抑制肿瘤血管新生, 发挥潜在的抗乳腺癌作用。此外, 植物细胞外囊泡展示出较好的生物安全性、相容性与稳定性, 其载药特性也逐渐受到关注和重视。GELNs 粒径小于 200 nm, 生物安全性较好, 提示后期可将其用于抗肿瘤、抗炎等药物靶向递送, 从而发挥“药辅双重”作用。

本研究围绕鲜甘草囊泡展开系统探索,开展甘草囊泡提取工艺与物质组成、理化特征研究,并对其体外安全性、抗肿瘤活性进行初步研究,为探究 GELNs 在抗肿瘤方面作用提供依据和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hao S Y, Yang H Y, Hu J J, *et al.* Bioactive compounds and biological functions of medicinal plant-derived extracellular vesicles [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 200: 107062.
- [2] Feng J J, Xiu Q, Huang Y Y, *et al.* Plant-derived vesicle-like nanoparticles as promising biotherapeutic tools: Present and future [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(24): e2207826.
- [3] 刘恬佳. 人参根外囊泡的提取工艺及其抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [4] Xu J L, Yu Y, Zhang Y, *et al.* Oral administration of garlic-derived nanoparticles improves cancer immunotherapy by inducing intestinal IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(10): 1569-1578.
- [5] 徐杰, 张志鹏, 陈丹燕, 等. 中药鲜药的现代应用与研究进展 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(1): 160-168.
- [6] 李亚楠, 王庸全, 许岩, 等. 中药鲜药的历史源流与发展策略思考 [J]. 世界中医药, 2022, 17(21): 2992-2997.
- [7] 王丽芳, 高文远. 论中药鲜药特色技术传承与发展 [J]. 中国民间疗法, 2016, 24(7): 8-10.
- [8] 江其龙. 鲜药的临床应用与推广 [J]. 光明中医, 2009, 24(3): 536-538.
- [9] Yang M Q, Xu L N, Wang W Y. Molecular anti-tumorigenic mechanism of *Radix Polygoni Multiflori*-derived exosome-like nanoparticles [J]. *Heliyon*, 2025, 11(4): e41918.
- [10] 高晓娟, 赵丹, 赵建军, 等. 甘草的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 193-198.
- [11] 黄菊, 张玮扬, 邹灿, 等. 甘草黄酮类成分抗肿瘤研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1456-1466.
- [12] 王明喜, 石志强. 生甘草炙甘草临证应用考辨 [J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(4): 383.
- [13] 张立平, 郑齐. 经典名方中生甘草与炙甘草应用分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(9): 1495-1498.
- [14] 周倩, 戴衍朋, 王亮, 等. HPLC 法测定生甘草、炙甘草中 6 种成分 [J]. 中成药, 2016, 38(2): 378-382.
- [15] 中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会中草药囊泡研究与应用专家委员会, 中草药囊泡广东省工程研究中心, 广东省中医药学会中草药囊泡研究与应用专业委员会, 等. 中草药囊泡研究与应用专家共识 (2023 年版) [J]. 中草药, 2024, 55(1): 12-22.
- [16] Lu Y, Xu J, Tang R, *et al.* Edible *Pueraria lobata*-derived exosome-like nanovesicles ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis associated lung inflammation through modulating macrophage polarization [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116098.
- [17] Zhao Q, Wang T, Wang H B, *et al.* Consensus statement on research and application of Chinese herbal medicine derived extracellular vesicles-like particles (2023 edition) [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(1): 3-12.
- [18] Zhao B, Lin H J, Jiang X C, *et al.* Exosome-like nanoparticles derived from fruits, vegetables, and herbs: Innovative strategies of therapeutic and drug delivery [J]. *Theranostics*, 2024, 14(12): 4598-4621.
- [19] 刘贵龙. 巴戟天小细胞外囊泡提取方法、表征及其生物活性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [20] Ou X Z, Wang H R, Tie H L, *et al.* Novel plant-derived exosome-like nanovesicles from *Catharanthus roseus*: Preparation, characterization, and immunostimulatory effect via TNF- α /NF- κ B/PU.1 axis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 160.
- [21] Yan G, Xiao Q Y, Zhao J Y, *et al.* *Brucea javanica* derived exosome-like nanovesicles deliver miRNAs for cancer therapy [J]. *J Control Release*, 2024, 367: 425-440.
- [22] Wang D, Lu J H, Liu Y, *et al.* Liquiritigenin induces tumor cell death through mitogen-activated protein kinase-(MPAKs-) mediated pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 965316.
- [23] 陈艳, 李滢, 杨琼, 等. 甘草次酸的生物活性及其应用研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7507-7518.
- [24] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [25] 王岭, 顾伟. 甘草抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(4): 416-421.

[责任编辑 李亚楠]